

Requested Patent: FR2786104A1

Title:

TREATMENT OF HEMATOLOGICAL OR SOLID TUMORS USING AN INHIBITOR OF THE ACTIVATION OF NUCLEAR FACTOR-KAPPAB, PARTICULARLY TO PREVENT DEVELOPMENT OF RESISTANCE TO CHEMOTHERAPEUTICS ;

Abstracted Patent: FR2786104 ;

Publication Date: 2000-05-26 ;

Inventor(s): HAEFFNER ASTRID;; HIRSCH FRANCOIS ;

Applicant(s): CENTRE NAT RECH SCIENT (FR) ;

Application Number: FR19980014858 19981125 ;

Priority Number(s): FR19980014858 19981125 ;

IPC Classification:

A61K38/27; A61K38/18; A61K38/19; A61K31/7008; A61K31/475; A61K31/337; C12N15/16; A61P35/00 ;

Equivalents: AU1564300, EP1131088 (WO0030587), A3, WO0030587 ;

ABSTRACT:

Use of an inhibitor (I) of the activation of nuclear factor-kappaB (II) to produce a pharmaceutical for: (i) treatment of malignant hemopathy or solid tumors; and (ii) preventing development of, or to treat, resistance to cytotoxins (III) being used in treatment of such diseases, where (III) is an activator of (II). An Independent claim is also included for products containing (I) and (III) for simultaneous, separate or sequential administration in treatment of malignant hemopathy or solid tumors.

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 786 104

(21) N° d'enregistrement national : 98 14858

(51) Int Cl⁷ : A 61 K 38/27, A 61 K 38/18, 38/19, 31/70, 31/475, 31/
337, C 12 N 15/16, A 61 P 35/00

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 25.11.98.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement
public à caractère scientifique et technologique — FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 26.05.00 Bulletin 00/21.

(55) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(72) Inventeur(s) : HIRSCH FRANCOIS et HAEFFNER
ASTRID.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMA-
CHY SARL.

(54) INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF-kB, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES.

(57) La présente invention a pour objet l'utilisation d'inhibiteurs du facteur nucléaire NF- κ B, dans le cadre du traitement de cancers, et plus particulièrement d'hémopathies malignes ou de tumeurs solides, ainsi que les produits contenant un composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalement dans le temps pour le traitement desdites pathologies.

FR 2 786 104 - A1



INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF-κB, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES

5 La présente invention a pour objet l'utilisation d'inhibiteurs biologiques de NF-κB, dans le cadre du traitement de cancers, et plus particulièrement d'hémopathies malignes ou de tumeurs solides.

10 De nombreuses cellules tumorales ont développé des mécanismes sophistiqués leur permettant de résister à l'effet de certains agents utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Une des parades actuelles développées par les cliniciens est l'augmentation du dosage de ces médicaments, avec pour conséquence une aggravation des effets secondaires observés chez les patients. Ainsi par exemple, la plupart des leucémies et certains lymphomes sont traités par l'administration d'anthracyclines (daunomycine, dauxorubicine) dont la toxicité se manifeste sur des fonctions vitales (hépatique, cardiaque...) (Gauthier, PH, 1987, Gaz Med Fr, 94:43-49).

15 Le mécanisme d'action de ces médicaments a été bien étudié et aboutit essentiellement à la mort des cellules tumorales par apoptose (Hannun YA, Blood, 89:1845-1853). Pour échapper à l'apoptose, les cellules utilisent une 20 catégorie de protéines codées par des gènes dénommés *multidrug resistant genes* (MDR) qui leur permettent de contrôler l'entrée ou la sortie de différentes molécules (Pastan I, Gottesman MM, 1991, Annu Rev Med, 42:277-286). Dans le cas des agents anticancéreux, ceux-ci sont évacués activement par l'intermédiaire de la P-glycoprotéine (P-gp), produit du gène *MDR1*.

25 Comme tout gène, l'expression des *MDR* est contrôlée par différents facteurs nucléaires. Ainsi, il a été récemment montré que le gène *MDR1* possédait dans sa partie régulatrice des sites de fixation du facteur NF-κB (Zhou G, Kuo MT, 1997, J Biol Chem, 272:15174-15183). Ce facteur nucléaire, qui 30 par ailleurs joue un rôle considérable dans de nombreuses situations inflammatoires (Barnes PJ, Karin M, 1997, N Engl J Med, 336:1066-1071) participerait à l'activation du gène *MDR1*.

35 Plusieurs travaux récents ont établi un lien entre l'inhibition de l'activation de NF-κB et la potentialisation de l'apoptose. Dans les premières expériences rapportées (Wang CY et coll., 1996, Science, 272:784-786, Van Antwerp DJ et coll., 1996, Science, 272:787-789) les auteurs ont validé leurs données en utilisant des lignées manipulées génétiquement pour obtenir l'inhibition ou la

surexpression de l'activité NF-κB. Ceci ne permet donc pas d'en tirer directement des applications thérapeutiques.

Dans une autre étude, les auteurs ont testé les effets de différents inhibiteurs de protéases empêchant l'activation de NF-κB (pyrrolidine dithiocarbamate, *N*-tosyl-L-lysyl chloromethylcétone, *N*-acétyl cystéine) sur une lignée de macrophages murins (Mannick EE et coll., 1997, *Mediators of Inflammation*, 6:225-232). Les auteurs de cet article concluent sur le lien possible entre l'inhibition de NF-κB et l'induction de l'apoptose des cellules inflammatoires et immunes.

Enfin, une autre approche axée sur l'inhibition des effets inflammatoires de NF-κB, a consisté à surexprimer l'inhibiteur naturel de NF-κB, la molécule IκB, par thérapie génique (Makarov SS et coll., 1997, *Gene Ther*, 4:846-852). Cette technologie est encore au stade de développement du fait de la complexité de la vectorisation nécessaire à son bon fonctionnement.

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs de nouveaux effets de l'hormone de croissance humaine (hGH), dénommée également somatotropine, à savoir d'une part que l'hGH, et autres composés se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I, sont des inhibiteurs de l'activation de NF-κB par une molécule cytotoxique, et, d'autre part que l'hGH, et autres composés susmentionnés, permettent de potentialiser les effets de molécules cytotoxiques et donc de réduire les concentrations de ces dernières dans le cadre de traitements thérapeutiques.

Tout d'abord, les Inventeurs ont observé que les monocytes humains répondaient moins à une stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) quand ils étaient cultivés en présence d'hGH recombinante exogène. Les Inventeurs en ont conclu que l'hGH inhibait l'activation de NF-κB après stimulation par les LPS (Haeffner A et coll., 1997, *J Immunol*, 158:1310-1314).

Puis, les Inventeurs ont mis en évidence que les monocytes humains mouraient après le pontage (ou l'engagement) de la molécule de surface APO1/CD95/Fas, et ont montré que l'hGH diminue la mort médiée à travers la molécule Fas, en augmentant la synthèse d'un proto-oncogène antiapoptogène, Bcl-2.

Enfin, les Inventeurs ont étudié les effets de l'hGH sur la réponse au TNF-α car Fas et le récepteur p55 du TNF-α appartiennent à la même famille des récepteurs de croissance nerveuse. La lignée leucémique promyéloïde humaine U937 a été utilisé pour réaliser ce travail, du fait de l'insensibilité des monocytes humains à la mort médiée par le TNF-α. L'obtention de résultats

inverses à ceux observés avec Fas, à savoir que l'hGH accélère la mort des cellules médiée par le TNF- α , a permis aux Inventeurs de conclure sur l'effet inhibiteur de l'hGH sur l'activation de NF- κ B par le TNF- α ou par d'autres molécules cytotoxiques activant NF- κ B, telle que la daunomycine.

5 Ainsi, la présente invention a pour but de fournir une nouvelle méthode de traitement des cancers, et plus particulièrement des hémopathies malignes et des tumeurs solides, offrant l'avantage d'améliorer à la fois la réponse des malades à certains traitements anticancéreux et également, potentiellement, l'état général du malade.

10 L'invention a également pour but de fournir de nouveaux produits destinés au traitement desdites pathologies, présentant à la fois l'avantage d'augmenter la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie, et celui d'améliorer l'état général des patients. Les nouveaux produits de l'invention permettent de diminuer l'activation du facteur NF- κ B par l'intermédiaire du composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B utilisé, tel que l'hormone de croissance humaine, ce qui est susceptible d'entrainer l'inhibition de la transcription des gènes *MDR* et donc un renforcement des effets cytotoxiques des agents antitumoraux utilisés, avec pour conséquence attendue la diminution du dosage de ces médicaments antitumoraux.

15 20 L'invention a pour objet l'utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de composés inhibiteurs de NF- κ B, pour la préparation de médicaments destinés à la prévention de l'apparition, ou au traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, ces phénomènes de résistance apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF- κ B.

30 35 Par composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B (encore désignés composés inhibiteurs de NF- κ B), on entend tout composé capable d'inhiber dans les cellules de l'organisme, l'activation de NF- κ B faite par des molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, et donc tout composé capable d'inhiber la synthèse de protéines (telle que la P-gp) permettant aux cellules d'évacuer ces molécules avant qu'elles n'aient pu atteindre leurs cibles moléculaires.

5 L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF-κB, en association avec une ou plusieurs molécules cytotoxiques utilisables dans le cadre du traitement des hémopathies malignes ou des tumeurs solides, lesdites molécules cytotoxiques étant susceptibles d'activer le facteur NF-κB.

10 Avantageusement, les composés inhibiteurs de l'activation de NF-κB utilisés dans le cadre de la présente invention, sont des composés se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme. De préférence, lesdits composés sont choisis parmi ceux se liant aux récepteurs susmentionnés dont les séquences en acides aminés des parties transmembranaires, intracytoplasmiques et extramembranaires présentent une homologie d'environ 50 % à environ 70 %.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF-κB tels que définis ci-dessus, choisis parmi l'hormone de croissance, la prolactine, l'érythropoïétine, l'interleukine-4, l'interleukine-7, le G-CSF, le GM-CSF, l'interleukine-3, l'interleukine-6, d'origine humaine ou autres mammifères.

20 De préférence, lesdits composés sont choisis parmi l'hormone de croissance, ou l'érythropoïétine.

25 A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée :

- de l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,

30 - ou, avantageusement, de l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.

35 L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF-κB.

5 L'invention a plus particulièrement pour objet encore l'utilisation susmentionnée de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification..

10 L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF-κB.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF-κB tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un médicament administrable par voie parentérale (IM, IV, SC), notamment à raison :

20 - d'environ 2 UI/kg de poids corporel/jour dans le cas de l'hormone de croissance humaine,
- d'environ 150 UI/kg de poids corporel/jour dans le cas de l'érythropoïétine humaine.

25 Parmi les molécules cytotoxiques susceptibles d'activer le facteur NF-κB utilisées en association avec lesdits composés inhibiteurs de l'activation de NF-κB dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,
- les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxole (ou Taxol, DCI).

30 Avantageusement, le dosage des molécules cytotoxiques utilisées en association avec lesdits composés est environ 2 à environ 5 fois inférieur au dosage de ces mêmes molécules utilisées seules dans le cadre du traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

A titre d'illustration :

35 - la posologie journalière usuelle de la daunomycine ou la dauxorubicine étant de 40 à 60 mg/m², la posologie de ces dernières dans le cadre la présente invention est d'environ 5 à 30 mg/m²,

- la posologie journalière usuelle de la vinblastine étant de 5 à 7 mg/m², la posologie de cette dernière dans le cadre la présente invention est d'environ 1 à 4 mg/m²,

5 - la posologie journalière usuelle de la vincristine étant de 1 à 2 mg/m², la posologie de cette dernière dans le cadre la présente invention est d'environ 0,1 à 1 mg/m²,

- la posologie journalière usuelle du taxol étant d'environ 75 mg/m², la posologie de ce dernier dans le cadre la présente invention est d'environ 15 à 35 mg/m².

10 Parmi les cancers susceptibles d'être traités dans le cadre de la présente invention, on peut citer principalement :

- les hémopathies malignes telles que leucémies, lymphomes,
- les tumeurs solides telles que celles de l'ovaire, ou du sein.

L'invention a également pour objet tout produit contenant :

15 - un composé inhibiteur de l'activation de NF-κB tel que décrit ci-dessus, et plus particulièrement un composé se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I tels que définis ci-dessus,

- et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF-κB, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, 20 séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

L'invention a également pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention de l'apparition, ou pour le traitement, de 25 phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF-κB.

L'invention concerne plus particulièrement tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF-κB, l'hormone de croissance, la prolactine, l'érythropoïétine, l'interleukine-4, l'interleukine-7, le G-CSF, le GM-CSF, l'interleukine-3, l'interleukine-6.

Des produits particulièrement préférés dans le cadre de la présente invention, sont ceux comprenant à titre de composé inhibiteur de l'activation de 35 NF-κB, l'hormone de croissance, ou l'érythropoïétine.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'hormone de croissance humaine telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,

5 - ou, avantageusement, l'hormone de croissance humaine recombinante telle que décrite ci-dessus, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de 10 la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

15 L'invention a également pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que décrite ci-dessus, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou 20 substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention concerne également tout produit tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, toute molécule choisie parmi les suivantes :

25

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,
- les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

30 Des produits tels que définis ci-dessus préférés dans le cadre de la présente invention, sont caractérisés en ce qu'ils contiennent :

- l'hormone de croissance et la daunomycine ou la dauxorubicine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 5 à 30 mg/m² de daunomycine ou dauxorubicine,
- l'hormone de croissance et la vinblastine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 1 à 4 mg/m² de vinblastine,

- l'hormone de croissance et la vincristine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 0,1 à 1 mg/m² de vincristine,
- 5 - l'hormone de croissance et le taxol, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 15 à 35 mg/m² de taxol,
- l'érythropoïétine et la daunomycine ou la dauxorubicine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 5 à 30 mg/m² de daunomycine ou 10 dauxorubicine,
- l'érythropoïétine et la vinblastine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 1 à 4 mg/m² de vinblastine,
- 15 - l'érythropoïétine et la vincristine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 0,1 à 1 mg/m² de vincristine,
- l'érythropoïétine et le taxol, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 15 à 35 mg/m² de taxol.

20 L'invention est illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de l'effet *in vitro* de l'hormone de croissance sur des lignées cellulaires tumorales.

1) Exemple n°1 :

25 Un gène de sélection (*neomycin resistant*, Neo^R) et le gène codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH) ont été co-transférés dans la lignée leucémique promyéloïde humaine U937. En comparant la lignée transfectée U937-hGH (qui produit de façon constitutive l'hGH à des doses physiologiques), soit à la lignée parentale U937, soit à une lignée transfectée 30 avec Neo^R seul, on observe par différentes approches méthodologiques que la lignée U937-hGH meurt davantage sous l'effet du *tumor necrosis factor* (TNF- α). Cette cytokine sécrétée par différents types de cellules immunes possède une activité antitumorale (Harakana, K et coll., 1984, Int J Cancer, 34:263-267) et est capable de promouvoir l'activation de NF-kB (Baeuerle PA, Henkel T, 1994, Ann Rev Immunol, 12:141-179).

35 Les cellules U937-hGH et les cellules contrôles U937-Neo ont été mises en culture pendant 48 heures en présence de concentrations croissantes de

TNF- α recombinant. A l'issue de cette culture, les cellules lavées ont été incubées en présence d'iodure de propidium qui s'incorpore dans l'ADN des cellules mortes. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

La Figure n°1 montre l'augmentation de l'incorporation d'iodure de propidium en fonction des doses croissantes de TNF- α exprimées en unités internationales (UI). Pour les cellules U937 (lignée "mère" ayant servi à obtenir les lignées U937-hGH), avec l'augmentation de la concentration de TNF- α on observe une légère augmentation du pourcentage de cellules fluorescentes (donc mortes) due à l'incorporation d'iodure de propidium (fluorescence rouge). Cette figure met par contre bien en évidence le fait que ces valeurs sont beaucoup plus élevées pour la lignée U937-hGH, en fonction des doses croissantes de TNF- α ajoutées au milieu de culture.

Il est ainsi démontré que la présence dans les cultures cellulaires d'hGH produite par les lignées U937 transfectées avec le gène de l'hGH, augmente leur susceptibilité à l'induction de mort médiaée par le TNF- α .

2) Exemple n°2 :

Ayant rapporté dans une étude précédente que l'hGH pouvait intervenir dans l'inhibition de l'activation de NF- κ B médiée par les lipopolysaccharides (Haeffner A et coll., 1997, J Immunol, 158:1310-1314), les Inventeurs ont étudié le statut de NF- κ B lors de la stimulation des différentes lignées par le TNF- α .

La Figure n°2 représente le résultat d'une analyse par gel retard. Sur ce gel ont été déposés des extraits nucléaires provenant des cellules U937-hGH et U937 (lignée "mère" ayant servi à obtenir les lignées U937-hGH) soumises à différents inducteurs dont le TNF- α ou le TNF- α et la cycloheximide (inhibiteur de synthèse protéique). Cette expérience indique clairement que la présence de NF- κ B dans les noyaux des cellules U937-hGH est diminuée par rapport aux cellules contrôles.

La présence de NF- κ B est attestée sur les lignes 4 et 5 qui représentent la migration des extraits nucléaires de cellules U937 stimulées par le TNF- α , et pré-incubés, soit avec une sonde froide NF- κ B mutée qui ne déplace pas le signal (ligne 4), soit avec une sonde froide NF- κ B homologue qui inhibe le signal (ligne 5).

La Figure n°3 représente le résultat d'un *enzyme immunoassay* (ELISA) réalisé avec le lysat de cellules U937-hGH et U937-Neo transfectées de façon

transitoire avec un plasmide contenant des séquences NF-κB dans le promoteur du gène rapporteur codant pour la chloramphenicol-acetyl-transférase (CAT) (Chiao P et coll., 1994, Proc Natl Acad Sci USA, 91:28-32).

5 Les cellules sont transféctées par électroporation puis incubées avec le TNF- α . A l'issue de la culture, les cellules sont lysées et l'activité CAT est mesurée par un ELISA commercial (Boehringer-Mannheim), selon les recommandations du fournisseur.

10 La figure montre que l'activité CAT, reflet de la présence de NF-κB, est diminuée dans les cellules U937-hGH par rapport aux cellules contrôles, après stimulation par le TNF- α .

Les résultats présentés dans les Figures 2 et 3 démontrent donc par deux approches méthodologiques différentes, que la synthèse de NF-κB est diminuée dans U937-hGH par rapport à la lignée contrôle.

15 3) Exemple n°3 :

L'utilisation du TNF- α étant très difficile en clinique humaine du fait des effets secondaires adverses, les Inventeurs se sont intéressés à la daunomycine. Cette anthracycline utilisée en thérapie anticancéreuse sous le nom de Cerubidine^R agit en s'intercalant dans les séquences de l'ADN cellulaire, perturbant de ce fait le fonctionnement cellulaire. Tout comme le TNF- α (Baeuerle PA, Henkel T, 1994, Ann Rev Immunol, 12:141-179), la daunomycine active NF-κB (Das KC, White CW, 1997, J Biol Chem, 272:14914-14920).

25 La Figure 4 indique que la lignée U937-hGH est également plus sensible que la lignée contrôle à la mort médiaée par la daunomycine.

4) Exemple n°4 :

30 Pour tester la possibilité d'utiliser l'objet de la présente invention sur des tumeurs non lymphoïdes, les Inventeurs ont utilisé l'hGH pour essayer d'inverser le phénotype "adriamycine resistant" de cellules isolées à partir d'un adénocarcinome ovarien humain IGROV/ADR (Bénard J et coll., 1985, Cancer Res, 45:4970-4979).

35 Comme illustré par la Figure 5, ces cellules sont insensibles à l'effet toxique de la daunomycine ajoutée à la culture (groupes hGH 0 ng/ml). L'adjonction d'hGH recombinante (Saizen^R, laboratoire Serono) rend ces

cellules sensibles à la daunomycine, avec un effet maximal observé pour la plus faible dose d'hGH utilisée ici, soit 5 ng/ml.

5 Ce résultat prouve d'une part que des résultats d'aggravation de mortalité peuvent être obtenus aussi bien avec de l'hGH exogène recombinante qu'avec les lignées transfectées susmentionnées, et que d'autre part, la présente invention peut s'appliquer à des tumeurs solides non lymphoïdes.

Légendes des figures :

10 - Figure 1 : Effet de l'hormone de croissance sur la mortalité des cellules exposées au TNF- α : le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules de la souche U937-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules de la souche U937-hGH ; les concentrations de TNF- α sont indiquées en abscisse en UI/ml.

15 - Figure 2 : Effet de l'hormone de croissance sur la translocation de NF- κ B ; la colonne 1 correspond aux cellules U937 de contrôle, la colonne 2 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α + cycloheximide, la colonne 3 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α , la colonne 4 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α + une sonde NF- κ B mutée, la colonne 5 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α + une sonde NF- κ B homologue, la colonne 6 correspond aux cellules U937-hGH de contrôle, la colonne 7 correspond aux cellules U937-hGH traitées par TNF- α + cycloheximide, la colonne 8 correspond aux cellules U937-hGH traitées par TNF- α ; la présence de NF- κ B est indiquée par une flèche.

20 - Figure 3 : Effet de l'hormone de croissance sur l'activité rapporteur CAT ; le pourcentage de variation de l'activité CAT est indiqué en abscisse ; les deux colonnes de gauche représentent les deux expériences effectuées sur les cellules U937-Neo, et les deux colonnes de droite représentent les deux expériences indépendantes effectuées sur les cellules U937-hGH.

25 - Figure 4 : Effet de l'hormone de croissance sur l'apoptose induite par la daunomycine ; le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules de la souche U937-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules de la souche U937-hGH ;

12

les pourcentages indiqués montrent l'augmentation de la mortalité des cellules ; les concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en μ M.

5 - Figure 5 : Effet de l'hormone de croissance sur l'apoptose de la lignée IGROV/ADR, induite par la daunomycine ; le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les différentes colonnes correspondant aux différentes concentrations d'hGH utilisées (0, 5, 50, 500, 1000 ng/ml) ; les concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en μ M.

13
LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

5

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 (B) RUE: 3, rue Michel-Ange
 (C) VILLE: PARIS
 10 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 75794 CEDEX 16

(ii) TITRE DE L' INVENTION: INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF- κ B, ET
 LEURS UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 20 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 609 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 30 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

35

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..609

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG GCT ACA GGC TCC CCG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC	48
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu	
45 1 5 10 15	

TGC CTG CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA	96
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu	
20 25 30	

50

TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT AGT CTC CGC GCC CAT CGT CTG CAC CAG	144
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln	
35 40 45	

55

14

CTG	GCC	TTT	GAC	ACC	TAC	CAG	GAG	TTT	AAC	CCC	CAG	ACC	TCC	CTC	TGT	192	
Leu	Ala	Phe	Asp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Asn	Pro	Gln	Thr	Ser	Leu	Cys		
50															60		
5	TTC	TCA	GAG	TCT	ATT	CCG	ACA	CCC	TCC	AAC	AGG	GAG	GAA	ACA	CAA	CAG	240
	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	
65															80		
10	AAA	TCC	AAC	CTA	GAG	CTG	CTC	CGC	ATC	TCC	CTG	CTG	CTC	ATC	CAG	TCG	288
Lys	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser		
															85		
15	TGG	CTG	GAG	CCC	GTG	CAG	TTC	CTC	AGG	AGT	GTC	TTC	GCC	AAC	AGC	CTG	336
Trp	Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu		
	100														105		
20	GTG	TAC	GGC	GCC	TCT	GAC	AGC	AAC	GTC	TAT	GAC	CTC	CTA	AAG	GAC	CTA	384
Val	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	Asn	Val	Tyr	Asp	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu		
	115														125		
25	GAG	GAA	GGC	ATC	CAA	ACG	CTG	ATG	GGG	AGG	CTG	GAA	GAT	GGC	AGC	CCC	432
Glu	Glu	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu	Asp	Gly	Ser	Pro			
	130														140		
30	TCA	CAC	AAC	GAT	GAC	GCA	CTA	CTC	AAG	AAC	TAC	GGG	CTG	CTC	TAC	TGC	528
Ser	His	Asn	Asp	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys		
	165														175		
35	TTC	AGG	AAG	GAC	ATG	GAC	AAG	GTC	GAG	ACA	TTC	CTG	CGC	ATC	GTG	CAG	576
Phe	Arg	Lys	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Val	Gln		
	180														185		
40	TGC	CGC	TCT	GTG	GAG	GGC	AGC	TGT	GGC	TTC	TAC	TAG				609	
Cys	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe	*							
	195														200		

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 203 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

50 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

55 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 20 25 30

15

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 35 40 45

5 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys
 50 55 60

Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln
 65 70 75 80

10 Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser
 85 90 95

Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu
 15 100 105 110

Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu
 115 120 125

20 Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro
 130 135 140

Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn
 145 150 155 160

25 Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys
 165 170 175

Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln
 30 180 185 190

Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe *

 195 200

35 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 582 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 40 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

45 (ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..582

50 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG GGG GTG CAC GAA TGT CCT GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC CTG
 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 55 205 210 215

48

16

CTG TCG CTC CCT CTG GGC CTC CCA GTC CTG GGC GCC CCA CCA CGC CTC	96
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu	
220 225 230 235	
5 ATC TGT GAC AGC CGA GTC CTG GAG AGG TAC CTC TTG GAG GCC AAG GAG	144
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu	
240 245 250	
10 GCC GAG AAT ATC ACG ACG GGC TGT GCT GAA CAC TGC AGC TTG AAT GAG	192
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu	
255 260 265	
15 AAT ATC ACT GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT GCC TGG AAG AGG	240
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg	
15 270 275 280	
20 ATG GAG GTC GGG CAG CAG GCC GTA GAA GTC TGG CAG GGC CTG GCC CTG	288
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu	
285 290 295	
25 CTG TCG GAA GCT GTC CTG CGG GGC CAG GCC CTG TTG GTC AAC TCT TCC	336
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser	
300 305 310 315	
25 CAG CCG TGG GAG CCC CTG CAG CTG CAT GTG GAT AAA GCC GTC AGT GGC	384
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly	
320 325 330	
30 CTT CGC AGC CTC ACC ACT CTG CTT CGG GCT CTG GGA GCC CAG AAG GAA	432
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu	
335 340 345	
35 GCC ATC TCC CCT CCA GAT GCG GCC TCA GCT GCT CCA CTC CGA ACA ATC	480
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile	
35 350 355 360	
40 ACT GCT GAC ACT TTC CGC AAA CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC CTC	528
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu	
365 370 375	
45 CGG GGA AAG CTG AAG CTG TAC ACA GGG GAG GCC TGC AGG ACA GGG GAC	576
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp	
380 385 390 395	
45 AGA TGA	582
Arg *	

50 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 194 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 5 1 .5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

10 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

15 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 20 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

25 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

30 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 35 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

40 Arg *

18
REVENDICATIONS

1. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation du facteur nucléaire
5 kB (NF-kB), pour la préparation de médicaments destinés au traitement des
hémopathies malignes et des tumeurs solides, et à la prévention de l'apparition,
ou au traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques
utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées,
apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont
10 susceptibles d'activer NF-kB.

2. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF-kB selon la
revendication 1, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des
hémopathies malignes et des tumeurs solides, en association avec une ou
15 plusieurs molécules cytotoxiques utilisables dans le cadre du traitement des
pathologies susmentionnées et susceptibles d'activer le facteur NF-kB.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, de composés
20 inhibiteurs de l'activation de NF-kB se liant spécifiquement aux récepteurs
transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme,
tels que les composés choisis parmi l'hormone de croissance ou
l'érythropoïétine.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 :
25 - de l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à
partir d'extraits hypophysaires, et purification,
- ou de l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée
par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence
nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et
30 étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la
séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de
croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de
vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus,
récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et
35 purification,
- ou de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression
et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2,

et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF-κB.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 :

5 - de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant 10 obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.,

15 - ou de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF-κB.

20 6. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF-κB selon l'une des revendications 1 à 5, en association avec une ou plusieurs molécules cytotoxiques susceptibles d'activer le facteur NF-κB choisies parmi :

25 - les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,
- les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxèle (ou Taxol, DCI).

30 7. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF-κB selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le dosage des molécules cytotoxiques utilisées en association avec lesdits composés est environ 2 à environ 5 fois inférieur au dosage de ces mêmes molécules utilisées seules dans le cadre du traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

35 8. Produits contenant un composé inhibiteur de l'activation de NF-κB et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF-κB, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

9. Produit selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B, un composé se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme, choisi notamment parmi l'hormone de croissance ou l'érythropoïétine.

10 10. Produit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,

15 - ou l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification,

20 - ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

25 11. Produit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.,

30 35 - ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4,

et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF-κB.

5 **12.** Produit selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF-κB, toute molécule choisie parmi les suivantes :

10 - les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,
- les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

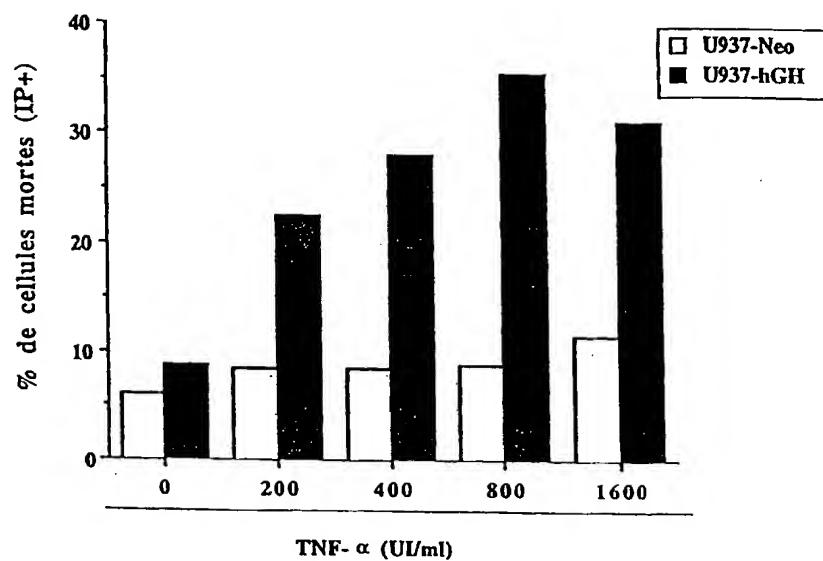


FIGURE 1

2/5

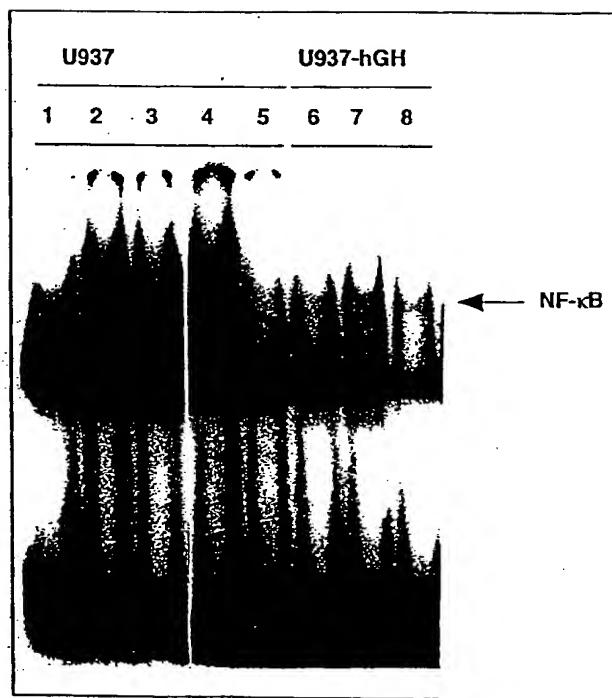


FIGURE 2

3 / 5

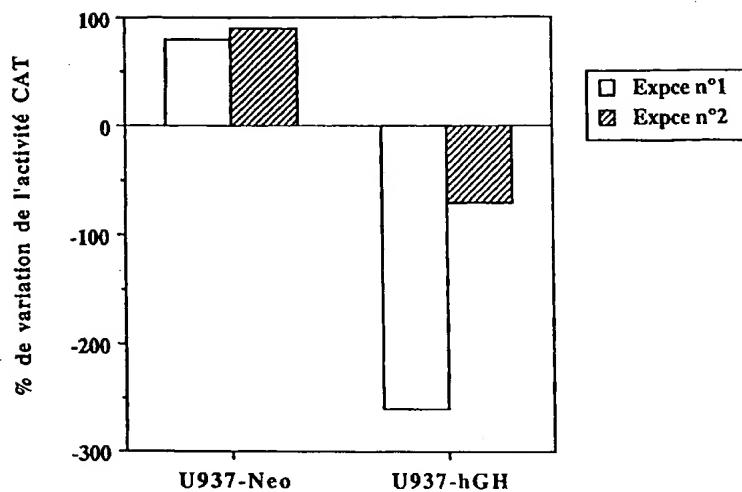


FIGURE 3

4 / 5

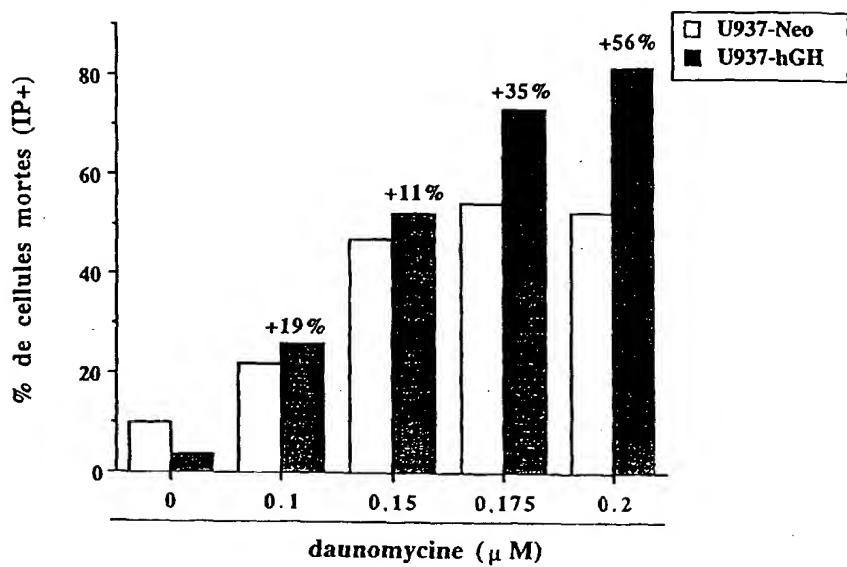


FIGURE 4

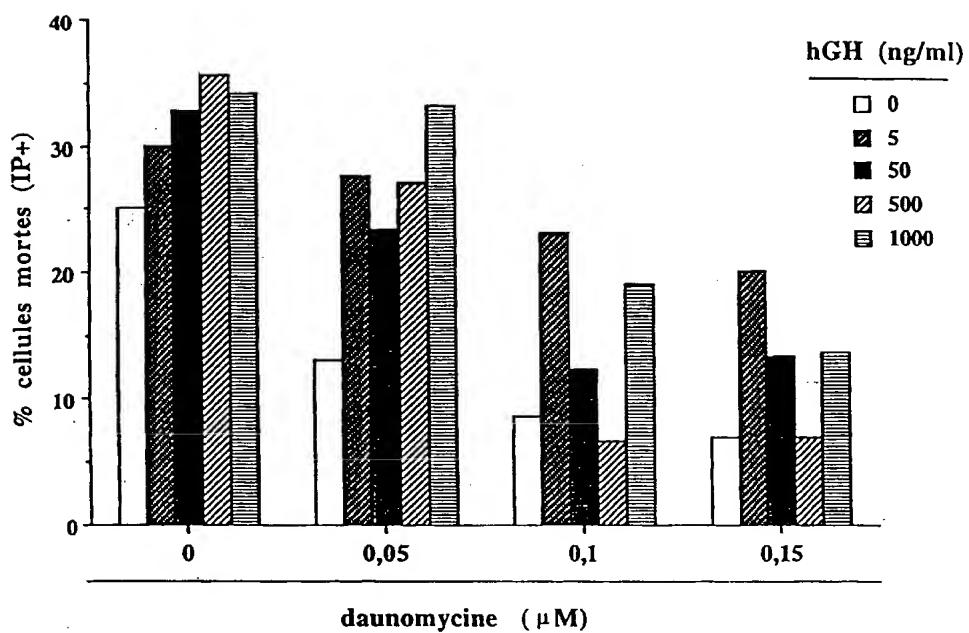


FIGURE 5

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

N° d'enregistrement
nationalFA 570216
FR 9814858établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concrètes de la demande examinée
Categorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	DIGICAYLI OGLU, MURAT ET AL: "Neuroprotection from nitric oxide by erythropoietin (EPO) is mediated by NF kappaB." SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, (1998) VOL. 24, NO. 1-2, PP. 1792. MEETING INFO.: 28TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, PART 2 LOS ANGELES, CALIFORNIA, USA NOVEMBER 7-12, 1998 SOCIETY FOR NEUROSCIENCE. , XP002116163 * le document en entier *	1,2
D,A	HAEFFNER A ET AL: "Inhibitory effect of growth hormone on TNF-alpha secretion and nuclear factor -kappaB translocation in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1997 FEB 1) 158 (3) 1310-4. , XP002116164 * le document en entier *	1-12
D,A	WANG C Y ET AL: "TNF- α cancer therapy-induced apoptosis potentiation by inhibition of NF-kappaB (see comments!)" SCIENCE, (1996 NOV 1) 274 (5288) 784-7. , XP002116165 * le document en entier *	1-12
E	WO 99 06040 A (BERRY C. ET AL) 11 février 1999 (1999-02-11) * page 32 - page 35 *	1,2

1

EPO FORM 1500.03.02 (P00/C13)	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
	22 septembre 1999	Moreau, J
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons B : membre de la même famille, document correspondant	